

## 学位論文の要旨

Cyclic GMP-AMP triggers asthma in an IL-33-dependent manner that is blocked by Amlexanox, a TBK1 inhibitor  
(Cyclic GMP-AMP は IL-33 依存的な気管支喘息を誘導し、  
TBK1 阻害剤はこの病態を改善する)

Koji Ozasa

小笹浩二

Department of pediatrics

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 発生生育小児医療学

医薬基盤健康栄養研究所 アジュバント開発プロジェクト

(研究指導教員 : 石井 健 プロジェクトリーダー)

( Doctoral Supervisor Shuichi Ito, Professor )

(指導教員 : 伊藤 秀一 教授)

# 学位論文の要旨

Cyclic GMP-AMP triggers asthma in an IL-33-dependent manner

that is blocked by Amlexanox, a TBK1 inhibitor

(Cyclic GMP-AMP は IL-33 依存的な気管支喘息を誘導し、

TBK1 阻害剤はこの病態を改善する)

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02212/full>

## <序論>

気管支喘息は発作性に起こる気道狭窄により、喘鳴・咳嗽・呼吸困難を繰り返す、気道の慢性炎症疾患である。先進国において有病率は増えており、日本においても有病率は増えている。気管支喘息はいくつかのフェノタイプに分かれており、小児期発症の気管支喘息については、2 型免疫応答が関与している(Wenzel, 2012)。感染・環境因子・遺伝的要因など様々な要因が発症に関与しているといわれているが、詳細な機序についてはわかっていない。ただ、幼少期に RSV・Rhino ウイルスなどによる下気道感染をおこすと、その後の気管支喘息発症の高リスクになることは、疫学調査からわかっている(Jartti and Gern, 2017)。

近年、ウイルス感染に伴う炎症の際に放出される自己の DNA が生体内の DNA センサーを刺激し、セカンドメッセンジャーである cyclic GMP-AMP (cGAMP) を誘導することが報告された(Wu et al., 2013)。この cGAMP は抗原とともに免疫をおこなうと、抗原特異的な 2 型免疫応答を誘導することを我々は報告している(Temizoz et al., 2015)。

そこで、ウイルス感染に伴い cGAMP が産生されることによって、気管支喘息発症に関与しているという仮説をたて実験をおこない、その解析を遺伝子欠損マウスでおこない、気管支喘息のあらたな治療標的分子の探索をおこなった。

### ＜実験材料と方法＞

ウイルス感染で生体内から DNA が検出されるかを確認するために,野生型マウスに RSV・インフルエンザウイルス (RNA ウイルス) を感染させ,肺胞洗浄液中の DNA の測定をした。

野生型マウスに cGAMP と抗原として House dust mite (HDM) を同時に点鼻投与し感作を成立させたのち,HDM のみの点鼻をおこなう実験をおこなった (cGAMP 喘息モデル) 。その後にサンプルを回収し解析した.サンプルとしては血清・肺胞洗浄液・肺組織・縦隔リンパ節を採取した.また,同様の実験を遺伝子欠損マウスでおこない,病態解析をおこなった.治療モデルとして,ステロイド投与と,病態解析から得られた結果をもとに TBK1 阻害剤を使用して,改善が得られるかを検討した。

### ＜結果＞

RNA ウイルスを感染させ,その後肺胞洗浄液中の DNA を測定すると,肺胞洗浄液中には多量の DNA が検出され,熱によりウイルスを不活化させた場合には,検出されなかった.このことから,生体由来の DNA が RNA ウイルス感染に伴って放出されることがわかった。

cGAMP と HDM を同時に投与し感作させたマウスでは,血中の抗原特異的 IgG1 と total IgE の増加を認め,肺胞洗浄液中の好酸球数の上昇も認めた.また,肺の組織像では goblet cell の過形成と炎症細胞浸潤が認められた.気道過敏性試験をおこなうと,コントロール群と比較して,気道過敏性の亢進が認められた.以上の結果から,cGAMP 喘息モデルは,好酸球性炎症を主体とする気管支喘息の病態を認めることがわかった.この実験を遺伝子欠損マウスでおこなうと,IL-33<sup>-/-</sup>マウスでは肺胞洗浄液中の好酸球数が著明に低下し,抗体価も低下した.Sting<sup>-/-</sup>, Tbk1<sup>-/-</sup>,Irf3<sup>-/-</sup>Irf7<sup>-/-</sup>それぞれのマウスでも同様に,好酸球数の低下と抗体価の低下が認められた。

治療モデルとして,ステロイド投与と TBK1 阻害剤を使用して実験したが,いずれの実験でもアレルギー性炎症の改善が得られた。

### ＜考察＞

cGAMP で誘導されるアレルギー性炎症は,好酸球性炎症を主体とする気管支喘息の病態になっていた.遺伝子欠損マウスの実験結果からは,獲得免疫依存的で,IL-33 依存的な病態であることがわかった.また TBK1 依存的であることも遺伝子欠損マウスの実験結果からわかったため,治療標的分子として考えた.TBK1 阻害剤である Amlexanox を治療としてこの喘息モデルに使用すると,アレルギー性炎症の改善が得られており,新規の喘息治療薬の候

補として考えられた。

<引用文献>

JARTTI, T. & GERN, J. E. 2017. Role of viral infections in the development and exacerbation of asthma in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140, 895-906.

TEMIZOZ, B., KURODA, E., OHATA, K., JOUNAI, N., OZASA, K., KOBIYAMA, K., AOSHI, T. & ISHII, K. J. 2015. TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type-II IFN. *Eur J Immunol*, 45, 1159-69.

WENZEL, S. E. 2012. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*, 18, 716-25.

WU, J., SUN, L., CHEN, X., DU, F., SHI, H., CHEN, C. & CHEN, Z. J. 2013. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science*, 339, 826-30.

# 論文目録

## I 主論文

Cyclic GMP-AMP Triggers Asthma in an IL-33-Dependent Manner That Is Blocked by Amlexanox, a TBK1 Inhibitor

OZASA, K., TEMIZOZ, B., KUSAKABE, T., KOBARI, S., MOMOTA, M., COBAN, C., ITO, S., KOBIYAMA, K., KURODA, E. & ISHII, K. J.

Frontiers in immunology, Vol 10, Page 2212, 2019

## III 参考論文

TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type-II IFN.

TEMIZOZ, B., KURODA, E., OHATA, K., JOUNAI, N., OZASA, K., KOBIYAMA, K., AOSHI, T. & ISHII, K. J.

Eur J Immunol, 45, 1159-69. 2015

Inhaled Fine Particles Induce Alveolar Macrophage Death and Interleukin-1alpha Release to Promote Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Formation.

KURODA, E., OZASA, K., TEMIZOZ, B., OHATA, K., KOO, C. X., KANUMA, T., KUSAKABE, T., KOBARI, S., HORIE, M., MORIMOTO, Y., NAKAJIMA, S., KABASHIMA, K., ZIEGLER, S. F., IWAKURA, Y., ISE, W., KUROSAKI, T., NAGATAKE, T., KUNISAWA, J., TAKEMURA, N., UEMATSU, S., HAYASHI, M., AOSHI, T., KOBIYAMA, K., COBAN, C. & ISHII, K. J.

Immunity, 45, 1299-1310. 2016